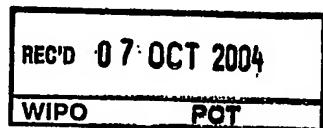




PCT/EP200 4/005516

MINISTERIO DE ECONOMIA, FOMENTO Y RECONSTRUCCION
DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

(15. 09. 2004)



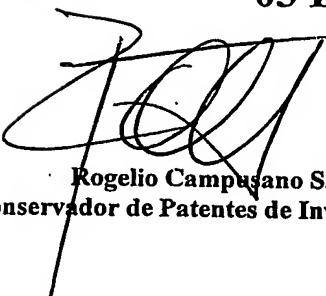
CERTIFICADO OFICIAL

El Jefe del Departamento de Propiedad Industrial y el Conservador de Patentes de Invención que suscriben, certifican que las copias (38) adjuntas corresponden a una solicitud de Patente de Invención.

Nº 178 - 2004

Presentada en Chile con fecha:

03 DE FEBRERO DE 2004


Rogelio Campusano Sáez
Conservador de Patentes de Invención


Meazier Bravo Maríquez
Departamento de Propiedad Industrial



PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Santiago, 24 de Agosto de 2004

BEST AVAILABLE COPY



GOBIERNO DE CHILE
SUBSECRETARIA DE ECONOMIA
Departamento de Propiedad Industrial

USO EXCLUSIVO D.P.J.

21	0178	200	11	Ne Registro
49	Fecha de Publicacion			
22	Fecha de Solicitud		45	Fecha de Registro

SOLICITUD DE PATENTE

12	TIPO DE SOLICITUD	PRIORIDAD	DOCUMENTOS ACOMPAÑADOS
<input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> PATENTE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL		31 N° _____ 32 FECHA _____ 33 PAIS _____ 31 N° _____ 32 FECHA _____ 33 PAIS _____ 31 N° _____ 32 FECHA _____ 33 PAIS _____	<input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input checked="" type="checkbox"/> MEMORIA DESCRIPTIVA <input checked="" type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS <input checked="" type="checkbox"/> PODER <input checked="" type="checkbox"/> CESION <input checked="" type="checkbox"/> COPIA PRIORIDAD <input checked="" type="checkbox"/> PROTOTIPO
54	TITULO O MATERIA DE LA SOLICITUD		
<p>Composición de labdanos diterpénicos extraídos de <i>Andrographis paniculata</i>, útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunes sin causar efectos secundarios no deseados y enfermedad de Alzheimer, mediante la inhibición del factor nuclear kappa B y la activación del receptor PPAR-gamma.</p>			
71	SOLICITANTE (Razón Social y/o Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombres - Calle, Comuna, Ciudad, País - Teléfono, Correo Electrónico)		
74	REPRESENTANTE (Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombres - Calle, Comuna, Ciudad, País - Teléfono, Correo Electrónico)		
<p>MICHELSSEN HAVERBECK, JUAN GUILLERMO; Paseo Bulnes 79, oficina 124, Santiago, Chile; 6883992; e mail: j.michelsen@entelchile.net</p>			
72	INVENTOR O CREADOR (Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombres - Calle, Comuna, Ciudad, País - Teléfono, Correo Electrónico)		
<p>HANCKE OROZCO, JUAN LUIS; e mail: jhancke@uach.cl BURGOS AGUILERA, RAFAEL AGUSTIN; e mail: rburgos1@uach.cl UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE; e mail: www.uach.cl Todos los solicitantes domiciliados en calle Independencia Nº 641, Valdivia, X Región De Los Lagos, Chile. Fono (63) 293015</p>			
<p>De conformidad con el Art. 44 de la Ley N° 19.039 sobre Propiedad Industrial, declaro/declaramos que los datos consignados en este formulario son verdaderos.</p> <p><i>Juan Guillermo Michelsen Haverbeck</i></p>			USO EXCLUSIVO D.P.I. RECEPCIÓN
Nombre / Firma Representante		Nombre y Firma Solicitante	

De conformidad con el Art. 44 de la Ley N° 19.039 sobre Propiedad Industrial, declaro/declaramos que los datos consignados en este formulario son verdaderos.

**USO EXCLUSIVO D.P.I.
RECEPCIÓN**

~~Juan Guillermo Michelsen Haverbeck~~

Nombre y Firma Sollicitante



VISITENOS EN: www.dpi.cl
LLENAR POR COMPUTADOR O MÁQUINA DE ESCRIBIR



(18) REPUBLICA DE CHILE
MINISTERIO DE ECONOMIA
FOMENTO Y RECONSTRUCCION
SUBSECRETARIA DE ECONOMIA

DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

(11) N° REGISTRO

(12) TIPO DE SOLICITUD:

<input checked="" type="checkbox"/> INVENCION	<input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD
<input type="checkbox"/> PRECAUCIONAL	<input type="checkbox"/> MEJORA
<input type="checkbox"/> REVALIDA	

(43) Fecha de Publicación:

(51) Int. Cl. °:

(21) Número de Solicitud:

(22) Fecha de Solicitud

(30) Número de Prioridad: (país, n° y fecha)

(72) Nombre Inventor(es): (Incluir dirección)

Universidad Austral de Chile
JUAN LUIS HANCKE OROZCO
RAFAEL AGUSTIN BURGOS AGUILERA
Todos domiciliados en calle Independencia 641
Valdivia, Chile.

(74) Representante: (Incluir dirección y teléfono)

JUAN GUILLERMO MICHELS
HAVERBECK fono 6883992; e mail:
j.michelsen@entelchile.net
Paseo Bulnes 79, oficina 124, Santiago, Chile.

(54) Título de la Invención: (máximo 330 caracteres)
Composición de labdanos diterpénicos extraídos de *Andrographis paniculata*, útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunes sin causar efectos secundarios no deseados y enfermedad de Alzheimer, mediante la inhibición del factor nuclear kappa B y la activación del receptor PPAR-gamma

(57) Resumen: (máximo 1600 caracteres)

Composición, caracterizada por estar constituida de moléculas identificadas como labdanos diterpénicos que se obtienen de una especie valorable a partir de un extracto natural procedente de la hierba seca de la planta *Andrographis paniculata*, para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, en seres humanos y animales, con una baja toxicidad y ausencia de efectos secundarios no deseados, actuando mediante la inhibición de la síntesis de citoquinas proinflamatorias, como efecto de la aminoración del factor nuclear kappa B y activación del receptor PPAR gamma. Asimismo, la nueva composición es útil para la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Esta nueva composición además de sus características terapéuticas propias, soluciona los inconvenientes de los actuales productos y procedimientos que tienen un importante nivel de toxicidad y/o causan efectos colaterales no deseados.

Tiene aplicaciones en los campos de la Inmunofarmacología, Farmacología Clínica y preclínica Humana y Veterinaria, Tecnología Farmacéutica, Reumatología, e Inmunología Clínica, Inmunoterapia, Transplante de Órganos y tejidos y las enfermedades inmunodeficientes como por ej. SIDA.



MEMORIA DESCRIPTIVA

El objeto principal de la Inmunofarmacología en conjunto con la biofarmacia, es la búsqueda de soluciones terapéuticas para modificar el curso y los síntomas de las diferentes enfermedades inmunológicas. En consecuencia, todo producto nuevo y su aplicación o la nueva aplicación de un producto existente, solucionan un problema actual de la técnica, tiene un uso industrial y constituye un invento. Es por esto, que cualquier composición, fármaco que la contenga, aplicación o aplicación nueva que resuelva este objetivo y su uso industrial, es una invención. Si la nueva aplicación industrial es resuelta dentro de un marco técnico económico y financiero, el resultado es una invención viable, cuyos beneficios, además de tocar la esfera de la técnica y la economía, es un aporte real para el bienestar y calidad de vida de los seres humanos.

La búsqueda de un tratamiento para las enfermedades autoinmunes ha significado un importante esfuerzo por encontrar productos y métodos adecuados, toda vez que la modalidad en que actúan estas enfermedades hacen particularmente difícil abordarlas con éxito.

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por una reacción espontánea del Sistema Inmunológico contra el propio organismo. Estas reacciones son causadas por el reconocimiento de los linfocitos T de autoantígenos, los que desencadenan respuestas inmunes de tipo humoral (producción de auto anticuerpos) y celular (aumento de la actividad citotóxica de linfocitos y macrófagos). Dentro de estas enfermedades se encuentran las enfermedades reumatoideas, psoriasis, dermatomiocitis sistémica, asma, esclerosis múltiple, lupus eritematoso. Este tipo de enfermedades son limitantes, crónicas y en algunos casos mortales y a la fecha no existe una cura para estas. Por lo tanto, cualquier medio que sirva para remitir o aminorar el curso de estas enfermedades representa una solución para la salud de los pacientes.

En la actualidad, el tratamiento de estas enfermedades se efectúa principalmente en base a inmunosupresores como los glucocorticoides, inhibidores de calcineurina, y anti-proliferativos-antimetabolitos. Sin embargo, estas terapias farmacológicas al actuar sobre distintos tejidos, reducen la función inmune o por sus efectos citotóxicos conllevan la desventaja que obligan a utilizarlas de modo permanente suprimiendo de manera inespecífica al sistema inmune, en general, de modo que los pacientes que utilizan estas terapias quedan expuestos al riesgo de infecciones y cáncer. Una desventaja adicional presentan los inhibidores de calcineurina y los glucocorticoides, debido a su



nefrotoxicidad y actividad diabetógena, efecto que limita su utilidad en diversas situaciones clínicas (Ej. insuficiencia renales, diabetes).

Los últimos avances terapéuticos en el área de la inmunosupresión son los anticuerpos monoclonales contra CD3, anticuerpos monoclonales contra el receptor IL-2 y anticuerpo monoclonal contra TNF α . A pesar de tener efectos inmunosupresores notorios, se describen con estos tratamientos reacciones de anafilaxia, infecciones oportunistas (Tuberculosis) y neoplasias, fiebre, urticaria, hipotensión, disnea, lo que igualmente significa un serio inconveniente en la aplicación de esas composiciones y sus productos farmacéuticos. En aplicaciones inyectables se han observado prurito, hinchazón, dolor en 1 de cada 3 pacientes.

La composición respecto de la cual se solicita este privilegio industrial, es capaz de disminuir la respuesta autoinmune, que caracteriza estas enfermedades, aliviando los síntomas y el curso de la enfermedad respectiva, pero conservando la "tolerancia inmunitaria" y en algunos casos, induciéndola.

En otras palabras, la composición que se describe, se caracteriza esencialmente por cuanto la tolerancia inmunitaria que genera, corresponde al estado activo de falta de reacción específica a un antígeno, sin provocar, con ello, los perjuicios de los actuales medicamentos inmunosupresores.

Específicamente, esta composición actúa inhibiendo la síntesis y expresión de interferón gama, a través de la reducción de la transcripción de NF kappa B y la estimulación del receptor PPAR gamma.

En consecuencia, esta nueva composición de labdanos diterpénicos tiene la virtud de reducir selectivamente la sobreexpresión de citoquinas que participan en la génesis de las enfermedades autoinmunes.

Avances recientes han podido sentar las bases de modelos inmunológicos para el desarrollo de nuevas estratégicas terapéuticas. La comprensión científica de los mediadores que participan en las enfermedades autoinmunes, inflamatorias agudas y crónicas, como asimismo del cáncer, han llevado a nuevas estrategias en la búsqueda de mejores terapias. Las aproximaciones tradicionales incluyen el uso de anticuerpos específicos, antagonistas de receptores e inhibidores de enzimas teniendo todos un nivel importante de efectos adversos (por ejemplo, alergias, úlceras gastrointestinales, hemorragias, etc.). Recientes hallazgos en el mecanismo regulatorio involucrado en la transcripción y expresión de una serie de mediadores (por Ej. COX2, INSTITUTO NACIONAL DE INVENTOS Y MARCAS - CHILE - 3 FEB 2004 -



iNOS, IL1beta, TNFalpha, ICAM, etc.) ha llevado a un interés creciente en aproximaciones terapéuticas dirigidas al nivel de la transcripción genética.

Uno de los más importantes mediadores es el NF-kappaB que pertenece a una familia íntimamente relacionada a complejos diméricos de factores de transcripción compuestos por varias combinaciones de familia de polipéptidos de Rel/NF-kappaB. La familia consiste de 5 productos de genes en mamíferos, RelA (p65), NF-kappaB1 (p50/p105), NF-kappaB2 (p49/p100), c-Rel, y RelB, todos pudiendo formar hétero o homodímeros. Estas proteínas comparten un aminoácido altamente homólogo 300 "Rel homology domain" que contiene los dominios de unión y dimerización de DNA. Al extremo del C-terminal del dominio homólogo Rel hay una secuencia de translocación nuclear importante en el transporte de NF-kappaB desde el citoplasma al núcleo. Además, p65 y cRel poseen potentes dominios de transactivación en el C-terminal.

La actividad de NF-kappaB es regulada por su interacción con un miembro de la familia de proteínas inhibidoras IkappaB. Esta interacción efectivamente bloquea la secuencia de localización en las proteínas de NF-kappaB, previniendo así la migración del dímero al núcleo. Una gran variedad de estímulos activan NF-kappaB a través de múltiples señales de transducción. Entre estas, se han descrito productos de bacterias (LPS), algunos virus (HIV-1, HTLV-1), citoquinas inflamatorias (TNFalpha, IL-1) y estrés ambiental. Aparentemente, común a todos los estímulos, es la fosforilación y subsecuente degradación de IkappaB, que es fosforilado en dos serinas por las quinasas de IkappaB (IKK-alfa y IKK-beta). Estudios de mutagenicidad dirigida indican que estas fosforilaciones son críticas para la activación subsecuente de NF-kappaB en donde una vez que se fosforila una proteína, esta se degrada por la vía proteosoma-ubiquitina. Libre de IkappaB, los complejos de NF-kappaB son capaces de translocar al núcleo donde se unen de una manera selectiva a secuencias específicas de genes. Incluidas en los genes regulados por NF-kappaB están las citoquinas, las moléculas de adhesión celular y las proteínas de fase aguda.

Es bien conocido que NF-kappaB juega un rol clave en la regulación de la expresión de una gran cantidad de mediadores pro-inflamatorios incluyendo las citoquinas como IL-6 e IL-8. Las moléculas de adhesión celular, como ICAM y VCAM, y sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS). Estos mediadores juegan un rol en el reclutamiento de leucocitos en los sitios de la inflamación y en el caso de iNOS, puede llevar a la destrucción del tejido, característica significativa de las enfermedades inflamatorias crónicas e autoinmunes.



La importancia de NF-kappaB en los trastornos inflamatorios esta sustentada por estudios de la inflamación de las vías aéreas, incluyendo asma, en donde NF-kappaB es activado. Esta activación podría explicar el aumento de la producción de citoquinas y la infiltración de leucocitos característica de estos trastornos. Además, se sabe que los esteroides inhalados reducen la hiperrespuesta de las vías aéreas y suprinen la respuesta inflamatoria de las vías aéreas en asmáticos. También se ha encontrado que los glucocorticoides, además de otros efectos inespecíficos, inhiben NFkappaB, lo que hace pensar que los efectos terapéuticos estarían mediados por una inhibición de NFkappaB.

En inflamaciones crónicas como artritis reumatoidea, se ha descrito también un rol de NF-kappaB. Aunque NF-kappaB esta normalmente presente como un complejo citoplasmático inactivo, estudios inmunohistoquímicos recientes de sinovia de pacientes con artritis reumatoidea indican que NF-kappaB está presente en el núcleo, y explicaría la gran actividad de estas células. Esta distribución podría ser el mecanismo de la producción aumentada de citoquinas y eicosanoides característica de estos tejidos.

El NF-kappaB/Rel y las proteínas IkappaB jugarían también un rol clave en la transformación neoplásica, asociado a transformación celular *in vitro* e *in vivo*, como resultado de la sobreexpresión, amplificación genética, y reagrupación o translocaciones de genes, lo que esta presente en un 20-25% de ciertos tumores linfoides.

Los primeros moduladores de NF-kB derivados de plantas medicinales fueron reportados hace casi una década por Kopp & Ghosh (1994) quien identifico al salicilato de sodio y su derivado semi-sintético, aspirina (a altas dosis), como un posible modulador de este factor. Siguiendo este descubrimiento, un número de productos naturales, de varias clases químicas han sido demostrados poseer actividad inhibidora de NF-kB [

Recientemente, se ha descrito que un importante mecanismo de la inhibición de NFkB podría involucrar la activación de los receptores a peroxisoma.

Los receptores a peroxisomas conocidos en su expresión en inglés como "Peroxisomes Proliferator Activated Receptors" (PPARs), [en atención al empleo habitual del término, expresado en sus siglas en inglés en estas áreas científicas, se empleará dicha sigla para identificar ese receptor] han sido implicados en las enfermedades autoinmunes y otras enfermedades como diabetes mellitus,



enfermedad cardiovascular y gastrointestinal, Alzheimer. Los actuales agentes farmacológicos con un efecto agonista PPAR gamma están aun en la fase experimental y todos tienen considerables efectos secundarios no deseados o dañinos para la salud humana, debido a su mecanismo de acción.

Por lo tanto, subsiste el problema, no resuelto aún, de desarrollar nuevos agentes para tratar eficazmente estos males y muy especialmente, causando menos efectos tóxicos o no deseados.

Esta nueva composición, al poder modular estos receptores, permite prevenir, tratar y /o aliviar las enfermedades mencionadas anteriormente, sin causar daños colaterales a los pacientes.

Los PPARs son miembros de la super familia de los receptores hormonales nucleares que son factores de transcripción que regulan la expresión genética. Muchos subtipos de PPARs han sido descubiertos, estos incluyen PPARalpha, PPARbeta o NUC1, PPARgamma y PPARdelta.

PPAR γ fue originalmente caracterizado como un regulador clave de la diferenciación adipocítica y del metabolismo lipídico. La expresión de PPAR γ está controlada por diferentes promotores, llevando a 3 isoformas de PPAR γ . Se sabe que PPAR γ se encuentra también en otros tipos celulares incluyendo fibroblastos, miocitos, células mamarias, la pulpa blanca y roja del bazo de la rata, precursores de la medula ósea y macrófagos/monocitos. Además, PPAR γ ha sido encontrado en células espumosas de macrófagos en placas ateroscleróticas. Un importante rol para PPAR γ ha sido identificado en el metabolismo de la glucosa al demostrarse que las tiazolidinedionas, drogas antidiabéticas, tienen alta afinidad por los ligandos PPAR γ . Las tiazolidinedionas fueron desarrolladas originalmente para el tratamiento de las diabetes tipo-2 sobre la base de su habilidad de bajar los niveles de glucosa (y los niveles de colesterol circulante) en modelos de roedores insulina resistentes. El descubrimiento que las tiazolidinedionas median su efecto terapéutico a través de una interacción con PPAR γ estableció que PPAR γ es un regulador clave para la homeostasis de la glucosa y lípidos. A pesar de ser descrito inicialmente como un regulador del metabolismo de los lípidos y glucosa, PPAR γ ha sido recientemente demostrado de tener un rol en la proliferación celular y cáncer maligno.

Además de las tiazolidinedionas, una variedad de drogas anti-inflamatorias no esteroidales también pueden funcionar como ligandos PPAR γ , aunque los últimos tienen afinidad relativamente baja. La prostaglandina D₂ (PGD₂) producto de la deshidratación de PGJ₂ fue el



primer ligando endógeno descubierto para PPAR γ . El PGD₂, producto de deshidratación, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂), es también una sustancia natural que se une directamente a PPAR γ y es un potente ligando para la activación de PPAR γ .

Uno de los primeros descubrimientos que asoció a los PPARs y macrófagos fue que PPAR γ estaba altamente expresado en macrófagos derivados de células humanas espumosas y de lesiones murinas ateroscleróticas. Posteriormente, se ha demostrado que PPAR γ se expresa en monocitos/macrófagos de ratones y humanos. Se ha demostrado que PPAR γ participa en la diferenciación y activación de los monocitos y la regulación de la actividades inflamatorias. Muchos estudios han demostrado que los ligandos PPAR γ inhiben las respuestas inflamatorias de los macrófagos. El efecto anti-inflamatorio de la activación de PPAR γ ha sido demostrado en líneas celulares de monocitos/macrófagos humanos y de ratones. La activación de macrófagos normalmente lleva a la secreción de muchos mediadores proinflamatorios. El tratamiento con 15d-PGJ₂ o tiazolidinedionas inhibe la secreción de muchos de estos mediadores (incluyendo gelatinasa B, IL-6, TNF- α , y IL-1 β) y también reduce la expresión de las NOS inducible (iNOS) y la transcripción del gen atrapador del receptor A.

La relevancia de PPAR γ ha sido estudiada en muchas enfermedades autoinmunes y modelos experimentales de éstas. Kawahito y col., demostró que el tejido sinovial expresaba PPAR γ en pacientes con artritis reumatoide. PPAR γ estaba altamente expresado en macrófagos y bajo en los fibroblastos de las sinoviales. La activación de PPAR γ por 15d-PGJ₂ y troglitazona induce apoptosis *in vitro* en los sinoviocitos. Se ha sugerido que PPAR γ es funcionalmente relevante en las células T aisladas o al menos es importante en las etapas tempranas de su activación. En estos estudios, se ha demostrado que estos dos ligandos para PPAR γ median la inhibición de la secreción de IL-2 de las células T y no inhiben la proliferación de IL-2- inducida por éstas.

Otros estudios han investigado el rol de los ligandos PPAR γ en modelos de animales de enfermedades autoinmunes. Su y col. mostró en un modelo de ratón de la enfermedad inflamatoria del intestino, que tiazolidinedionas reducían significativamente la inflamación colónica. Se ha propuesto que este efecto puede ser el resultado de un efecto directo sobre las células epiteliales, que expresan altos niveles de PPAR γ y que pueden producir citoquinas inflamatorias. Kawahito y col. demostró que la administración i.p. de ligandos de PPAR, 15d-PGJ₂ y troglitazona, alivian la artritis inducida por adyuvante. Nino y col. examinó el efecto de una tiazolidinediona en encéfalomielitis alérgica



experimental y encontró que este tratamiento atenúa la inflamación y disminuye los síntomas clínicos en el modelo de la esclerosis múltiple. Finalmente, Reilly y col., demostró que las células renales glomerulares mesangiales son importantes moduladores de la respuesta inflamatoria en lupus nefrítico, secretando, cuando son activadas, mediadores inflamatorios incluyendo NO y productos ciclooxygenasa, así perpetuando la respuesta inflamatoria local.

Todos estos antecedentes indican la relevancia y utilidad de los agonistas PPARs para el tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes.

El efecto de PPAR γ sobre NF- κ B ha sido también estudiado. Por ejemplo, el 15d-PGJ₂ que es un agonista de PPAR γ mostró inhibir y modificar directamente la subunidad IKK2 de IKK (Rossi y col.). Esto, a su vez, previene la fosforilación de las proteínas I κ B que luego impactan estas proteínas para la conjugación con ubiquitina y su degradación. Esto previene la activación de NF- κ B. Similarmente, Castrillo y col. mostró, en macrófagos RAW 264.7 tratados con LPS e IFN- α , que la incubación con 15d-PGJ₂ resultó en una significativa inhibición de la actividad IKK2 y una inhibición de la degradación de las proteínas inhibitorias I κ Bs. Esto causa una inhibición parcial de la actividad de NF- κ B y una expresión inhibida de los genes que requieren activación de NF- κ B, como el iNOS y COX- 2.

Por lo tanto, se puede concluir que PPAR γ y NF- κ B por su rol de mediadores, juegan un rol importante en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, por lo que la industria farmacéutica está buscando fármacos y medicamentos selectivos para estos mediadores.

Por otro lado, la Enfermedad de Alzheimer's (EA) se caracteriza por el depósito extracelular de fibrillas de β -amiloide dentro del cerebro y la activación de células microgliales asociadas a la placa de amiloide. La microglia activada subsecuentemente secreta diversos productos inflamatorios. Kitamura y col. estudio la ocurrencia de PPAR γ y COX-1, COX-2, en cerebros normales y con EA usando anticuerpos específicos encontrándose una expresión aumentada de estas substancias en los cerebros con EA. Los antiinflamatorios no esteroidales (AINES) han demostrado ser eficaces en reducir la incidencia o riesgo de EA y atrasan la progresión de la enfermedad. Combs y col. demostró que AINES, tiazolidinedionas, y PGJ₂, (agonistas de PPAR γ), inhiben la secreción de β -amiloide estimulada por productos inflamatorios de microglia y monocitos. Los agonistas PPAR γ han demostrado ser capaces de inhibir la estimulación de β -amiloide sobre los genes IL-6 y TNF- α y la expresión de COX-2. Heneka y col demostró que la microinyección de LPS y IFN- α al



cerebelo de la rata induce la expresión de iNOS en las células cerebelares con su consecuente muerte celular. La coinyección de agonistas de PPAR γ (incluyendo troglitazona y 15d-PGJ₂) reducen la expresión de iNOS y la muerte celular, mientras que la coinyección de un inhibidor selectivo de la COX no tiene efecto. En general, los estudios sugieren que los agonistas PPAR γ pueden modular las respuestas inflamatorias en el cerebro y que los AINES pueden ser útiles en la EA como un resultado de su efecto PPAR γ .

De lo precedentemente expuesto, se puede concluir que:

Hasta ahora, no existen antecedentes sobre compuestos agonistas de PPAR- γ aislados de plantas medicinales.

En la actualidad no existen composiciones con estas propiedades para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes ya individualizadas.

Esta nueva composición, en cambio, es capaz de reducir la producción de citoquinas proinflamatorias, las que se encuentran aumentadas en las enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas.

La composición a diferencia de las actuales es poco tóxica, y no tiene efectos dañinos o no deseados.

Dado el actual estado de la Ciencia, no resulta deducible por peritos en la materia, el empleo de esta composición, que en sí misma constituye una novedad innovativa, destinada a estos tratamientos con las propiedades enunciadas, ya que conservara la tolerancia inmunitaria, sin causar efectos adversos, como ocurre con las sustancias que actualmente se emplean para su tratamiento.

Andrographis paniculata (Nees), es una planta medicinal perteneciente a la familia Acanthaceae originaria de Asia, nativa de India, Malasia, China y Corea. En estos países ha sido ampliamente utilizada por los efectos beneficiosos que posee tanto la planta fresca, seca y sus componentes en diferentes enfermedades, como resfrió común, afecciones hepáticas, diabetes, etc.

En la actual solicitud de patente se describe una composición nueva para inhibir la activación del factor de transcripción NF-kappaB usando una mezcla de andrografolídos con propiedades agonistas de PPAR- γ , extraídos de esta planta; mediante la aplicación el procedimiento que al efecto se describe.



Descripción de la composición de Andrografolidos

La composición respecto de la cual se solicita privilegio, comprende una mezcla de labdanos diterpénicos obtenidos a partir de un extracto de la planta *Andrographis paniculata*, cuyas formulas generales son :

$C_{20}H_{30}O_5$	Andrografolido
$C_{20}H_{30}O_4$	Deoxiandrografolido
$C_{26}H_{41}O_8$	Neoandrografolido

La estructura química de estos compuestos esta descrita en las figuras 6, 7 y 8.

Un compuesto representativo de esta composición, lo constituye la siguiente formulación farmacéutica:

Andrografolido 24,6%,
Deoxiandrografolido 4,8%
Neoandrografolido 0,6%

Dicha formulación admite preparar medicamentos, suministrable a través de un vehículo farmacéuticamente aceptable, como por ejemplo, en la forma de comprimidos, los que han sido aplicados en las siguientes dosis:

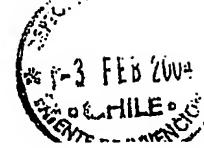
- a) 1-5 mg andrografolido/kg por día
- b) 0.01-0.2 mg 14-deoxiandrografolido/kg por día
- c) 0.001-0.02 mg neoandrografolido/ kg por día.

Sin perjuicio de otras modalidades de formulación y suministro, las descritas, contribuyen eficiente y eficazmente al tratamiento de las enfermedades autoinmunes ya individualizadas y al mal de Alzheimer, según se detalla en los ejemplos que siguen.

Es así como tanto la composición en sí misma, como su formulación farmacéutica, particularmente cuando se suministra en la forma de comprimidos y en las dosis precedentemente indicadas, tienen la propiedad de servir de medicamentos para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes como las siguientes: esclerosis múltiple, lupus exantemático, psoriasis, osteoartritis, dermatomictitis sistémica, diabetes mellitus; y también en el tratamiento del mal de Alzheimer.

Debido a su mecanismo de acción, es de utilidad también en el tratamiento del SIDA y de pacientes a los que se les han transplantados órganos.

Las composiciones farmacéuticas que se pueden elaborar a partir de la composición, especialmente siguiendo la formulación anotada, pueden corresponder a formas farmacéuticas enterales, parenterales,



dérmicas, oculares, nasales, óticas, rectales, vaginales, uretrales, bucales, faringo-tráqueo-bronquiales.

Metodología de obtención y análisis de la materia prima:
Andrographis paniculata

Ingrediente activo: *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees, familia: Acantaceae. Parte usada: aérea.

Las hojas verdes y la parte superior del tallo incluyendo las semillas son secadas al sol. Todas las materias extrañas son removidas manualmente y cortan a un tamaño de 1-1,5 cm. Este material seco y cortado es almacenado en una aérea ventilada. Se realizan análisis de rutina para evaluar su identidad: análisis macro y microscópicos según Farmacopea Europea, y características organolépticas y análisis de TLC (cromatografía en capa fina)

Metodología de obtención de extracto seco de *Andrographis paniculata*

La extracción de *A. paniculata* es desarrollada por una percolación continua de la planta seca molida (parte aérea) con soluciones hidroetanólicas (70% etanol/agua).

La planta seca molida debidamente analizada a un tamaño de partícula con un molino de martillo con cuchilla (0.8 cm²). El material molido es depositado en un percolador de acero inoxidable y la solución de extracción se agrega a una temperatura de 70° C. El tiempo de percolación es de 6 días en dos ciclos de extracción independientes. El percolado se colecta en tanques de acero inoxidable hasta que la percolación es completada. El percolado es transferido a una unidad de evaporación para eliminar el etanol y gran parte del agua. La evaporación se desarrolla en un evaporador LUWA a 60-70° C y con un vacío de 0.65-0.85 bar. El proceso de evaporación es realizado en 3-4 ciclos., donde el extracto se mantiene mezclándose 4x 30 minutos por día. En el extracto espeso se realizan los siguientes análisis: cenizas -HCl, perdida por secado, pH, identidad por TLC y HPLC, análisis para andrografolido, deoxiandrografolido y neoandrografolido. Despues el extracto espeso es transferido a una unidad de secado. Antes del proceso de secado, el extracto es mezclado con una cantidad suficiente de maltodextrina usado como vehículo y secado por difusión (spray) a una temperatura interna de 175-195° C. El extracto seco es envasado en bolsas plásticas en tambores de fibras para su posterior análisis.

Metodología de identificación de labdanos diterpénicos

A un gramo de extracto de la planta se le adicionan 20 ml de metanol, se agitan alrededor de 1 hora y se permite que decante el metanol a través de un filtro. Se agita el residuo con 20 ml de metanol, se filtra y mezcla con el primer extracto. Esto permite obtener una solución de prueba de 40 ml. Se usan como soluciones referencias andrografolido, deoxiandrografolido y neoandrografolido disueltos en metanol. Se



aplica 20-30 μ L de la solución de muestra a una placa de TLC (sílica gel GF254) y se deja correr 15 cm utilizando una mezcla de 77:15:8 (acetato de etilo: metanol: agua). Posteriormente se seca la placa al aire y examinar en UV (254nm). La placa revelará unas pocas manchas oscuras estando andrografolido a un Rf de 0.65-07; deoxiandrografolido Rf: 0.75-0.8 y neoandrografolido, Rf: 0.60-0.65.

Metodología HPLC de cuantificación de labdanos diterpénicos

Los 3 compuestos son extraídos con acetona (4:1) y luego analizados por HPLC usando una columna RP-C18 licrospher de fase reversa (4x125mm). La fase móvil utilizada fue 26% acetonitrilo y 0.5% de ácido fosfórico, con un flujo de 1.1 ml/min, y detectado a 228 nm según lo publicado por Burgos y col; 1999, Acta Hort. (ISHS) 501:83-86.

El extracto seco de *Andrographis paniculata* se estandariza a un 30% de andrografolidos totales que contienen un porcentaje de andrografolido 24,6%, deoxiandrografolido 4,8% y neoandrografolido 0,6% para su posterior fabricación de distintas formas farmacéuticas.

Los compuestos en se aíslan siguiendo los procedimientos descritos por Starma, *Phytochem Anal.* 3;(3). 129-131, 1992; Chakravarti; *J. Chem. Soc.* 1952, Cava y col, *Tetrahedron* 18, 397 1963; Kleipool, *Nature* 169, 1952, Weiming y Xiaotian, *Planta Médica*, Vol. 45, 245 1982; Kapil y col, *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 46, 182, 1993. Matsuda y col, *Chem. Pharm. Bull.* 42(6), 1994

La composición sobre la que versa esta solicitud no ha sido descrita en el estado actual de la ciencia y no existe ningún antecedente del uso de esta para dar solución a los problemas metodológicos descritos para las enfermedades autoinmunes y EA.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero en ningún caso limitan la invención:

EJEMPLO N°1

Obtención del Extracto *Andrographis paniculata* Nees, hierba, seca 100, 0 mg.

(Andrografolidos totales 30%)

Otros ingredientes:

Almidón de papa	168.8 mg
Talco	106,9 mg
Gelatina	11,5 mg



Estereato de magnesio	5,6 mg
Shellac	3,5 mg
Dióxido de silicio, anhidro	2,0 mg
Politilen glicol	0,7 mg
Peso del comprimido	450,0 mg

Método de suministro

Esta composición farmacéutica puede ser dispensada como formas farmacéuticas enterales, parenterales, dérmicas, oculares, nasales, óticas, rectales, vaginales, úretrales y bucales.

EJEMPLO N°2

Una cantidad suficiente del extracto de *Andrographis paniculata* para la fabricación de 1000.000 de comprimidos contenido la concentración de los labdanos andrografolido, deoxiandrografolido y neoandrografolido es comprimido en forma directa con los ingredientes inactivos mencionados en el ejemplo N°1.

EJEMPLO N°3

Diferenciación celular inducida por la COMPOSICION en células HL-60

Reactivos: May Grunwald-Giemsa, NBT, ácido retinoico, citocalasina B, penicilina, estreptomicina, glutamina, suero fetal bovino (Sigma), RPMI 1640 (GIBCO), suero fetal bovino de Boehringer Mannheim, todos los ácidos trans-retinoico fueron adquiridos de Aldrich. Los otros compuestos fueron donados por Amsar Pvt. Ltd., India. FURA2-AM fue obtenido de Molecular Probes (USA). Nitro azul de tetrazolium de Sigma.

Cultivo Celular: Las células HL 60 se cultivaron en un medio RPMI 1640 suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado con temperatura, 2 mM glutamina, 100 IU/ml penicilina, y 100 pg/ml estreptomicina a 37 °C en una atmósfera húmeda contenido 5% CO₂. Las células fueron sembradas 2 veces a la semana, 3x10⁵ células/ml. La diferenciación fue inducida añadiendo 100 nM de ácido trans-retinoico, solo o asociado a la COMPOSICION (17.5µg/ml) y se evaluó por un cambio en la morfología con la tinción de May Grunwald-Giemsa y la capacidad para reducir NBT' (11). Los cultivos no diferenciados contenían menos de 3% de células NBT positivas. Los cultivos diferenciados fueron evaluados 5 días después del tratamiento con ácido retinoico.



Medición de Calcio $[Ca^{2+}]_c$

Granulocitos HL-60 ($2 \times 10^7/ml$) fueron cargados con 2 μM fura-2/AM en un medio de 1mM Ca^{2+} y 0.1% de suero de albúmina de bovino por 45 min a 37 °C, y diluida a 10^7 células/ml y mantenidas en hielo. Antes de su uso, 0.5 ml de esta suspensión fue centrifugada y resuspendida en 2.4 ml del medio. La fluorescencia de Fura-2 fue medida en una cubeta con termostato (37° C) (LS55 fluorímetro, Perkin-Elmer Corp.) a 340 y 380nm de excitación y 505nm longitud de onda de emisión.

EJEMPLO N° 4

Inhibición de la producción de IL-2 y IFN- γ en células T tratadas con la composición.

Reactivos: concanavalina A y medio RPMI 1640 de Sigma.

Cultivos celulares

Ratones Rockefeller fueron sacrificados con éter y los ganglios poplíticos y el bazo fueron puestos en una placa Petri conteniendo 5 ml de un medio para cultivo RPMI 1640. Las células linfáticas fueron obtenidas al romper estos órganos en una solución estéril de RPMI 1640, luego los linfocitos fueron re-suspendidos en 1 ml de RPMI 1640 y cuantificados en una cámara Neubauer. Finalmente, la suspensión de los linfocitos fue ajustada a una concentración de 4×10^6 células por ml RPMI. Los linfocitos fueron cultivados en presencia o ausencia de la composición. Placas de cultivo de poliestireno con 24 pocillos (2 ml cada uno); conteniendo 1 ml de células y diferentes concentraciones de la composición y 1 ml del mitógeno concanavalina A (CONA, 0 $\mu g/ml$ y 10 $\mu g/ml$) fueron usadas.

Las placas son incubadas en un horno a 37° C en una humedad de 5% y CO_2 por 24 h, se obtiene una muestra de 2 ml y se centrifuga por un minuto a 3200 rpm. Luego, las células son congeladas en alícuotas de 0.6 y las citoquinas detectadas por ELISA.

ELISA para IL-2 e IFN- γ

Reactivos: IL-2 e IFN gamma de Pharmingen; TMB de Pierce, H_2O_2 , H_2SO_4 de Merck.

Para la determinación de las citoquinas (IL-2 & IFN) se usa un primer anticuerpo que se une al anti-antígeno y un segundo anticuerpo que se conjuga a una enzima peroxidasa y una solución Standard para la curva de calibración. Se usan placas de ELISA "de alta unión" de poliestireno con 96 pocillos. Se agrega 100 μl por pocillo del primer anticuerpo diluido en buffer carbonato pH 9.5 con el objetivo de facilitar el pegado al pocillo, se incuba durante la noche a 4° C para asegurar



la unión a la parte sólida. Se elimina el contenido del pocillo y se lava con 300 μ l tween 20; 0, 05 % p/v y PBS pH 7.0 por 3 veces. Luego, al pocillo se le agrega 200 μ l de leche descremada 5% y PBS, se incuba por 1 hora a temperatura ambiente. Despues, el contenido del pocillo se elimina y se lava como se explico anteriormente. Las muestras, 100 μ l por pocillo en duplicado y el antígeno 100 μ l para la curva de calibración específica de cada citoquina se incuban por 2 horas a temperatura ambiente. Despues el contenido del pocillo es eliminado y lavado 5 veces de acuerdo al protocolo anterior. Se agrega un segundo anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa y se diluye en una solución de PBS y SBF al 10%, y 100 μ l se sembró por pocillo y se dejó a temperatura ambiente por una hora. Se lava 7 veces y se reveló con una solución de TMB y H_2O_2 , 100 μ l por pocillo y se revela en la oscuridad 30 minutos despues, la reacción es detenida con H_2SO_4 2M; 50 μ l por pocillo. Los resultados de la reacción son medidos por ELISA con un filtro de 450 η m (Elx800 Universal Microplate Reader, BioteK).

EJEMPLO N° 5

Estimulación del receptor de PPAR- γ por la Composición.

Reactivos: Dimetilsulfoxido comprado a Merck. Los otros reactivos comprados a PROMEGA.

Ensayos de Transcripción: las células HL-60 son transfectadas con pCMX-hPPAR γ 1, la expresión del vector humano de PPAR γ 1 bajo el control de un promotor citomegalovirus. Las actividades de luciferasa y β -galactosidasa son determinadas y la actividad de luciferasa normalizada a un standard β -galactosidasa en células HL-60.

Plasmidos: El plasmido que expresa GAL4-DNA el dominio de unión (DBD) y el dominio de unión del mPPAR γ (pGAL4DBD-mPPAR γ) es construido al insertar el dominio de unión de rata al ligando PPAR γ 1 (de aminoácidos 162-475), aislado como un fragmento de *Scal/Bam*HI de pGBTmPPAR γ 1 in-frame a pCMXGal4 DBD.

Las células son tratadas con DMSO o 17.5 μ g/ml, y la actividad de la luciferasa es medida en un luminómetro.

EJEMPLO N° 6

Inhibición de NF- κ B en neutrófilos, por aplicación de la Composición.

Reactivos: dimetilsulfóxido (DMSO), de Merck; suero bovino fetal y medio RPMI-1640 de Gibco, USA; azul nitro de tetrazolio de Sigma,



pRL-TK, pGL3 y Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega); Fugene6 de Roche;

Cultivo celular

Se utiliza una línea celular mieloide HL-60 de leucemia aguda mieloide. Estas células se pueden diferenciar en la presencia de dimetilsulfóxido 1.3% (DMSO) (Santos-Benedit y col., 2000). Las células se mantienen en un medio RPMI-1640 suplementado con 2 mM L-glutamina 10% de suero fetal bovino inactivado por temperatura y antibióticos y 5% CO₂ y 37° C. Las células se diferencian a neutrófilos al incubarlos con 1.3% de DMSO por 4 días. Las células diferenciadas se analizan con nitro azul de tetrazolio (NBT)

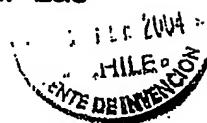
Transfección del vector de NFkB-pGL3 en células HL-60 y medición de la luciferasa.

Las células HL-60 son cultivadas y diferenciadas a neutrófilos por 4 días como se ha descrito ampliamente. El DIA 4, las células son transfectadas con los vectores pGL3-NFkB y como un control interno se usa el vector pRL-TK (Promega) que es un vector de expresión que contiene un promotor de timidina quinasa del virus herpes simplex y que permite la expresión de moderados niveles de *Renilla* luciferasa. Estos vectores son transfectados a las células por un sistema basado en liposomas (Fugene6, Roche). Una vez realizada la transfección, las células son mantenidas por 24 h, y estimuladas por PAF a diferentes tiempos en presencia y ausencia de la COMPOSICIÓN. Los extractos celulares se mantienen a -70° C para la medición de la actividad de luciferasa. La actividad de la luciferasa se mide en un luminómetro, con un sistema comercial Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) que posee el substrato de las enzimas de la luciérnaga (pGL3) y *Renilla* (pRL) luciferasa.

Inmunoblot de IkBa

Reactivos: PMSF y PAF adquiridos de Calbiochem. Tris, NaCl, NP-40, deoxicolato, sodio dodecilsulfato, inhibidores protease, mercaptoetanol de Merck.

Los neutrófilos son preincubados por 10 minutos, y luego estimulados con (0.1 uM) PAF (0.1 μ M) por 60 min. Para el análisis de las proteínas, las células son lisadas (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato, 0.1% sodio dodecilsulfato, 1mM Na₂VO₄, 1mM PMSF y 10 μ g/ml de inhibidores de proteasas). Las proteínas son cuantificadas por el método de Bradford, sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS/PAGE) 12%, y electro transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las



membranas son incubadas con anticuerpos anti-I_kB_α y luego con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa y visualizado con quimioluminiscencia (ECL). Como un control de la cantidad de proteínas en el gel, los anticuerpos son removidos con una solución *stripping* (100 mM 2-mercaptoetanol, 2 % SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7) e incubados con un anticuerpo anti-actina. Finalmente, se realiza un análisis densitométrico para cada una de las señales de cada anticuerpo.

EJEMPLO N° 7

Inhibición de la formación de β -amiloide en ratas mediante uso de la Composición.

Formación de Amiloide

Para confirmar la formación de amiloide se usan 2 técnicas complementarias, tioflavina-T fluorescencia y Congo rojo. Brevemente, el ensayo de tioflavina -T se basa en la emisión de fluorescencia de la tioflavina cuando se une a las fibrillas de amiloide, mostrando un aumento de la emisión de a 482 nm cuando se excita a 450 nm. El ensayo de rojo Congo es muy específico para cuantificar y determinar la cantidad de amiloide formado.

EJEMPLO N° 8

Descripción de un compuesto a partir de la Composición de Andrografolidos.

Una composición representativa de la presente invención es una formulación farmacéutica del tipo comprimidos, que suministra la siguiente mezcla de los siguientes compuestos:

Andrografolido 24,6%,
Deoxiandrografolido 4,8%
Neoandrografolido 0,6%

para su posterior fabricación de distintas formas farmacéuticas, los que son aplicados en las siguientes dosis:

- a) 1-5 mg andrografolido/kg por día.
- b) 0.01-0.2 mg 14-deoxyandrografolido/kg por día
- c) 0.001-0.02 mg neoandrografolido/ kg por día.

La estructura química de estos compuestos esta descrita en las figuras 6, 7 y 8, respectivamente.



EJEMPLO N° 9

Eficacia Clínica de una Formulación Oral para el tratamiento de *Lupus eritematoso*

Usando la mezcla de andrografolidos descritas en el ejemplo 7, una normalización de los síntomas del lupus ocurre 3 meses después de la administración de la composición. La composición no interfiere con los efectos de otras drogas anti-inflamatorias no esteroidales.

EJEMPLO N° 10

Eficacia Clínica de una Formulación Oral para el tratamiento de *Esclerosis múltiple*

Usando una mezcla de andrografolidos descritas en el ejemplo 7, una normalización de los síntomas de la enfermedad ocurre 3 meses después de la administración de la composición y no interfiere con los efectos de otras drogas anti-inflamatorias.

EJEMPLO N° 11

Eficacia Clínica de una Formulación Oral para artrosis y artritis reumatoidea.

Usando una mezcla de andrografolidos descritas en el ejemplo 7, una normalización de los síntomas de la enfermedad ocurre 3 meses después de la administración de la composición y no interfiere con los efectos de otras drogas anti-inflamatorias no esteroidales, glucosalina, crondoitina sulfato u otras drogas anti-inflamatorias. La composición no interfiere con los efectos reparadores de las articulaciones de los constituyentes proteoglicanos, como sucede con los agentes anti-inflamatorios no esteroidales.

EJEMPLO N° 12

Eficacia Clínica de una Formulación Oral para el Tratamiento de *Diabetes mellitus*

Usando una mezcla de andrografolidos descritas en el ejemplo 7, una normalización de los síntomas de la enfermedad ocurre 2 meses después de la administración de la composición y no interfiere con los efectos benéficos de otros tratamientos para reducir la glicemia.



EJEMPLO N° 13

Eficacia Clínica de una Formulación Oral para el Tratamiento del SIDA

Una formulación oral descrita en el ejemplo 7 se administra a pacientes que manifiestan y son HIVpositivos. Un recuento normal de CD4 se restaura después de 3 meses de tratamiento.

EJEMPLO N° 14

Eficacia Clínica de una Formulación Oral para el Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer

Se describe una formulación como descrita en el ejemplo 7 que es administrada a pacientes que han manifestado las etapas tempranas de la EA, como fuera diagnosticada por su médico y confirmada por un neurólogo independiente. Dos semanas antes del ensayo clínico, los pacientes se van a someter a una serie de tesas psicológicos como el examen Mini Mental Status Exam (MMSE), el Alzheimer Disease Assessment Scale (ADAS), el Boston Naming Test (BNT), y el Token Test (TT). Los tests psicológicos son repetidos el día 0, 6 semanas y 3 meses después de iniciado el ensayo clínico. Los tests son realizados por neuropsicólogos utilizando el modelo del doble ciego.

Los pacientes recibirán al azar ya sea la composición o un placebo al principio del estudio. La composición y el placebo se toman 2 veces al día. Se permite el tratamiento de condiciones como diabetes, hipertensión, etc. durante el estudio. Se comparan estadísticamente los resultados de la composición y placebo para todos los períodos del estudio. Los pacientes con el placebo muestran un significativo deterioro cognitivo. Los pacientes tratados con la composición mejoran considerablemente los puntajes en los tests.

REFERENCIAS

Patentes U.S. A

6.629.835	Octubre 7, 2003	Babish, y col.
6.492.425	Diciembre 10, 2002	Callahan, y col.
6.86.438	Julio 1, 2003	Piper
6.610.696	Agosto 26, 2003	Brooks, y col.

T. Lemberger, B Desvergne and W. Wahli Peroxisome proliferators-activated receptor: A Nuclear receptor Signaling Pathway in Lipid Physiology Annual. Rev. Cell Dev. Biol. 1996. 12:335-63



C. Wahl, et al. *J. Clin. Invest.* 101(5), 1163-1174 (1998),
 R. W. Sullivan, et al. *J. Med. Chem.* 41, 413-419 (1998),
 J. W. Pierce, et al. *J. Biol. Chem.* 272, 21096-21103 (1997). The marine natural product hymenialdisine is known to inhibit NF- κ B.

Roshak, A., et al., *JPET*, 283, 955-961 (1997).
 Breton, J. J and Chabot-Fletcher, M. C., *JPET*, 282, 459-466 (1997).
 M. T. Clark, R. A. Coburn, R. T. Evans, R. J. Genco, *J. Med. Chem.*, 1986, 29, 25-29.

Bhat and Nanavati, 1978

Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J. R., Chen, X. N., Noya, D., Sambasiva-Rao, M., Reddy, J. K. (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR α isoforms *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92,7921-7925

Tontonoz et al., 1994 mPPAR α 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer *Genes Dev* 8,1224-1234

Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauca, M., Wahli, W. (1996) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat *Endocrinology* 137,354-366

Greene, M. E., Blumberg, B., McBride, O. W., Yi, H. F., Kronquist, K., Hsieh, L., Greene, G., Nimer, S. D. (1995) Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor α cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping *Gene Expr* 4,281-299

Ricote, M., Huang, J., Fajas, L., Li, A., Welch, J., Najib, J., Witzum, J. L., Auwerx, J., Palinski, W., Glass, C. K. (1998) Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95,7614-7619 (a)

Lehman, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkinson, W. O., Wilson, T. M., Kliewer, S. A. (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator activated receptor α . *J. Biol. Chem.* 270,12953-12956

Sarraf, P., Mueller, E., Jones, D., King, F. J., DeAngelo, D. J., Partridge, J. B., Holden, S. A., Chen, L. B., Singer, S., Fletcher, C., Spiegelman, B. M. (1998) Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR α . *Nat. Med.* 4,1046-1052

Lefebvre, A., Chen, I., Desreumaux, P., Najib, J., Fruchart, J., Geboes, K., Briggs, M., Heyman, R., Auwerx, J. (1998) Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor α promotes the development of colon tumors in C57BL/6j-APCmin/+ mice. *Nat. Med.* 4,1053-1057

Lehmann, J. M., Lenhard, J. M., Oliver, B. B., Ringold, G. M., Kliewer, S. A. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are



activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs *J. Biol. Chem.* 272,3406-3410

Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G., Chen, H., Evans, R. M. (1998) Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell* 93,229-240

Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J., Glass, C. K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation *Nature* 391,79-82 (b)

Jiang, C., Ting, A. T., Seed, B. (1998) PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines *Nature* 391,82-86

Kawahito, Y., Kondo, M., Tsubouchi, Y., Hashiramoto, A., Bishop-Bailey, D., Inoue, K., Kohno, M., Yamada, R., Hla, T., Sano, H. (2000) 15-Deoxy-delta (12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats *J. Clin. Investig.* 106,189-197

Kitamura, Y., Shimohama, S., Koike, H., Kakimura, J., Matsuoka, Y., Nomura, Y., Gebicke-Haerter, P. J., Taniguchi, T. (1999) Increased expression of cyclooxygenases and peroxisome proliferator-activated receptor- γ in Alzheimer's disease brains *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254,582-586

McGeer, P. L., Schulzer, M., McGeer, E. G. (1996) Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies *Neurology* 47,425-432

Combs, C. K., Johnson, D. E., Karlo, J. C., Cannady, S. B., Landreth, G. E. (2000) Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of β -amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPAR γ agonists *J. Neurosci.* 20,558-567

Su, C. G., Wen, X., Bailey, S. T., Jiang, W., Rangwala, S. M., Keilbaugh, S. A., Flanigan, A., Murthy, S., Lazar, M. A., Wu, G. D. (1999) A novel therapy for colitis utilizing PPAR- γ ligands to inhibit the epithelial inflammatory response *J. Clin. Investig.* 104,383-389

Nino, M., Iwabuchi, K., Kikuchi, S., Ato, M., Morohashi, T., Ogata, A., Tashiro, K., Onoe, K. (2001) Amelioration of experimental allergic encephalomyelitis in C57Bl/6 mice by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma *J. Neuroimmunol.* 116,40-48

Reilly, C. M., Oates, J. C., Cook, J. A., Morrow, J. D., Halushka, P. V., Gilkeson, G. S. (2000) Inhibition of mesangial cell nitric oxide in MRL/lpr mice by prostaglandin J2 and proliferator activation receptor- γ agonists *J. Immunol.* 164,1498-1504

Rossi, A., Kapahl, P., Natoll, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., Santoro, M. G. (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase *Nature* 403,103-108

Castrillo, A., Diaz-Guerra, M. J. M., Hortelano, S., Martin-Sanz, P., Bosca, L. (2000) Inhibition of I κ B kinase and I κ B phosphorylation by 15-deoxy- Δ 12, 14, prostaglandin J(2) in activated murine macrophages *Mol. Cell. Biol.* 20,1692-1698



Chen CC, Sun YT, Chen JJ, Chang YJ. Tumor necrosis factor-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogen-activated protein kinases, and IkappaB kinase 1/2 in human alveolar epithelial cells. *Mol Pharmacol.* 2001, 59:493-500.

Lee, F. S., J. Hagler, Z. J. Chen, and T. Maniatis. Activation of the IkBa kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* 88:213-222 (1997)

Yin, M. J., L. B. Christerson, Y. Yamamoto, Y. T. Kwak, S. Xu, F. Mercurio, M. Barbosa, M. H. Cobb, and R. B. Gaynor. HTLV-1 Tax protein binds to MEKK1 to stimulate IkappaB kinase activity and NF-kappaB activation. *Cell* 93:875-884 (1998)

Nakano, H., M. Shindo, S. Sakon, S. Nishimaka, M. Mihara, H. Yagita, and K. Okumura. Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 95:3537-3542 (1998)

Karin, M., and M. Delhase. JNK or IKK, AP-1 or NFkB, which are the targets for MEK kinase 1 action? *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 95:9067-9069 (1998).

Cheng y Tang, 1991

Melchior y col, Double-blind, placebo-controlled pilot and phase III study of activity of standardized Andrographis paniculata Herba Nees extract fixed combination (Kan jang) in the treatment of uncomplicated upper-respiratory tract infection. *Phytomedicine.* 7(5): 341-50 (2000).

Hancke y col.; A double-blind study with a new monodrug Kan Jang of Symptoms and improvement in the recovery from common colds. *Phytotheraphy Res.* 9:559-562, (1995).

Cáceres y col. Use of visual analogue scale measurements (VAS) to asses the effectiveness of standardized Andrographis paniculata extract SHA-10 in reducing the symptoms of common cold. A randomized double blind-placebo study. *Phytomedicine.* 1999 Oct; 6(4): 217-23.

Habtemariam. Natural inhibitors of tumour necrosis factor-alpha production, secretion and function. *Planta Med.* 66(4): 303-13, (2000)

Gérald J. Prud'homme Altering immune tolerance therapeutically: the power of negative thinking. (2003).

Roshak, A. K., y col., *J. Biol. Chem.*, 271, 31496-31501, (1996).

C. Wahl, et al. *J. Clin. Invest.* 101(5), 1163-1174 (1998).

R. W. Sullivan, et al. *J. Med. Chem.* 41, 413-419 (1998).

J. W. Pierce, et al. *J. Biol. Chem.* 272, 21096-21103 (1997).

B. Roshak, A., et al., *JPET*, 283, 955-961 (1997).

Breton, J. J and Chabot-Fletcher, M. C., *JPET*, 282, 459-466 (1997).

M. T. Clark, R. A. Coburn, R. T. Evans, R. J. Genco, *J. Med. Chem.*, 29, 25-29 (1986)



LeVine, H. (1993): Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* 2:404-410.

Soto C, Branes MC, Alvarez J, Inestrosa NC (1994): Structural determinants of the Alzheimer's amyloid β -peptide. *J. Neurochem.* 63:1191-1198. Review.

Inestrosa NC, Alvarez A, Perez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C et al (1996): Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 16:881-891.

Alvarez A, Opazo C, Alarcón R, Garrido J, Inestrosa NC (1997): Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid- β -peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J. Mol. Biol.* 272:348-361



PLIEGO DE REIVINDICACIONES

1. Composición CARACTERIZADA porque comprende una mezcla de labdanos diterpénicos obtenidos a partir de un extracto de la planta *Andrographis paniculata*, cuyas fórmulas generales son:

$C_{20}H_{30}O_5$ **Andrografolido**

$C_{20}H_{30}O_4$ **Deoxiandrografolido**

$C_{26}H_{41}O_8$ **Neoandrografolido**

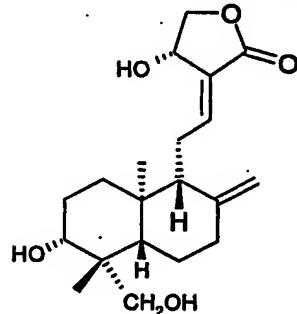
2. Una composición, según la reivindicación Nº1, CARACTERIZADA porque está constituida por **andrografolido**:

i.) fórmula general: $C_{20}H_{30}O_5$

ii.) peso molecular : 350.46

iii.) nomenclatura molecular: 3-[2-[decahidro-6-hidroxi-5-(hidroximetil)-5,ha-dimetil-2-metilen-1-naftalenil]etilideno]dihidro-4-hidroxi-2(3h)-furanona.

iv.) estructura molecular:



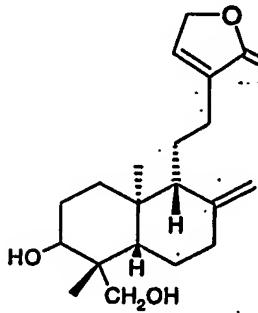
3. Una composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA porque está constituida por **deoxiandrografolido**:

i.) fórmula general: : $C_{20}H_{30}O_4$

ii.) peso molecular: 336.46

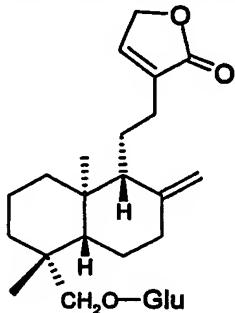
iii.) nomenclatura molecular:

iv.) estructura molecular:



4. Una composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA porque está constituida por **neoandrografolido**:

- i.) fórmula general: $C_{26}H_{41}O_8$
- ii.) peso molecular:
- iii.) nomenclatura molecular:
- iv.) estructura molecular:



5. Uso de la composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA porque sirve para preparar un medicamento.

6. Uso de la composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA porque sirve para preparar un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades autoinmunes.

7. Uso de la composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA porque en particular, sirve para preparar un medicamento destinado al tratamiento de la artritis reumatoidea.

8. Uso de la composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA porque en particular, sirve para preparar un medicamento destinado al tratamiento de lupus exantemático.

9. Uso de la composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA porque en particular, sirve para preparar un medicamento destinado al tratamiento de esclerosis múltiple.

10. Uso de la composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA porque sirve para preparar un medicamento destinado a la prevención y tratamiento de enfermedad de Alzheimer.

11. Uso de la composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA porque en particular, sirve para preparar un medicamento destinado al tratamiento del asma.

12. Uso de la composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA porque en particular, sirve para preparar un medicamento destinado al tratamiento de la psoriasis.



13. Uso de la composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA porque en particular, sirve para preparar un medicamento destinado al tratamiento de dermatomiocitis sistémica.
14. Uso de la composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA porque en particular, sirve para preparar un medicamento destinado al tratamiento de la osteoartritis.
15. Uso de la composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA por que sirve para preparar un medicamento destinado al tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).
16. Uso de la composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA por que sirve para preparar un medicamento destinado al tratamiento de la diabetes mellitus.
17. Uso de la composición, según la reivindicación Nº 1, CARACTERIZADA por que sirve para preparar un medicamento destinado al tratamiento del rechazo en pacientes con transplantes de tejidos y órganos.
18. Composiciones farmacéuticas, CARACTERIZADAS porque incluyen los compuestos de la reivindicación Nº 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, aportando las siguientes moléculas en las proporciones que se indican:

a) andrografolido	24,6%
b) deoxiandrografolido	4,8%
c) neoandrografolido	0,6%
19. Composición, según las reivindicación Nº 18, CARACTERIZADA por una formulación farmacéutica del tipo comprimidos.
20. Composición, según las reivindicación Nº 19, CARACTERIZADA por que se suministra por vía oral aportando las siguientes dosis de las siguientes moléculas:
 - a) 1- 5 mg andrografolido/kg por día.
 - b) 0.02-0.5 mg 14-deoxiandrografolido/kg por día
 - c) 0.001-0.02 mg neoandrografolido/ kg por día.
21. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 19 y Nº 20, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes.



22. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 19 y Nº 20, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento de la artritis reumatoidea.
23. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 19 y Nº 20, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento de lupus exantemático.
24. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 19 y Nº 20, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento de la esclerosis múltiple.
25. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 19 y Nº 20, CARACTERIZADA porque sirve para la prevención y tratamiento de enfermedad de Alzheimer.
26. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 19 y Nº 20, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento del asma.
27. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 19 y Nº 20, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento de la psoriasis.
28. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 19 y Nº 20, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento de dermatomiocitis sistémica.
29. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 19 y Nº 20, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento de la osteoartritis.
30. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 19 y Nº 20, CARACTERIZADA por que sirve para el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).
31. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 19 y Nº 20, CARACTERIZADA por que sirve para el tratamiento de la diabetes mellitus.
32. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 19 y Nº 20, CARACTERIZADA por que sirve para el tratamiento del rechazo en pacientes con transplantes de tejidos y órganos.
33. Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación Nº 18 CARACTERIZADAS porque pueden corresponder a formas farmacéuticas enterales, parenterales, dérmicas, oculares, nasales, óticas, rectales, vaginales, uretrales, bucales, faringo-



tráqueo-bronquiales, aportando las siguientes moléculas en las proporciones que se indican:

a) andrografolido	24,6%
b) deoxiandrografolido	4,8%
c) neoandrografolido	0,6%

34. Composiciones farmacéuticas, según la reivindicación Nº 33 CARACTERIZADAS por que se suministran por las vías correspondientes, en las siguientes dosis:
 - a) 1- 5 mg andrografolido/kg por día.
 - b) 0.02-0.5 mg 14-deoxiandrografolido/kg por día
 - c) 0.001-0.02 mg neoandrografolido/ kg por día.
35. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 33 y Nº 34, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes.
36. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 33 y Nº 34, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento de la artritis reumatoidea.
37. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 33 y Nº 34, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento de lupus exantemático.
38. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 33 y Nº 34, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento de la esclerosis múltiple.
39. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 33 y Nº 34, CARACTERIZADA porque sirve para la prevención y tratamiento de enfermedad de Alzheimer.
40. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 33 y Nº 34, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento del asma.
41. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 33 y Nº 34, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento de la psoriasis.
42. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 33 y Nº 34, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento de dermatomiocitis sistémica.
43. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 33 y Nº 34, CARACTERIZADA porque sirve para el tratamiento de la osteoartritis.



44. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 33 y Nº 34, CARACTERIZADA por que sirve para el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).
45. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 33 y Nº 34, CARACTERIZADA por que sirve para el tratamiento de la diabetes mellitus.
46. Uso de la composición, según las reivindicaciones Nº 33 y Nº 34, CARACTERIZADA por que sirve para el tratamiento del rechazo en pacientes con transplantes de tejidos y órganos.



FIGURAS

Figura 1

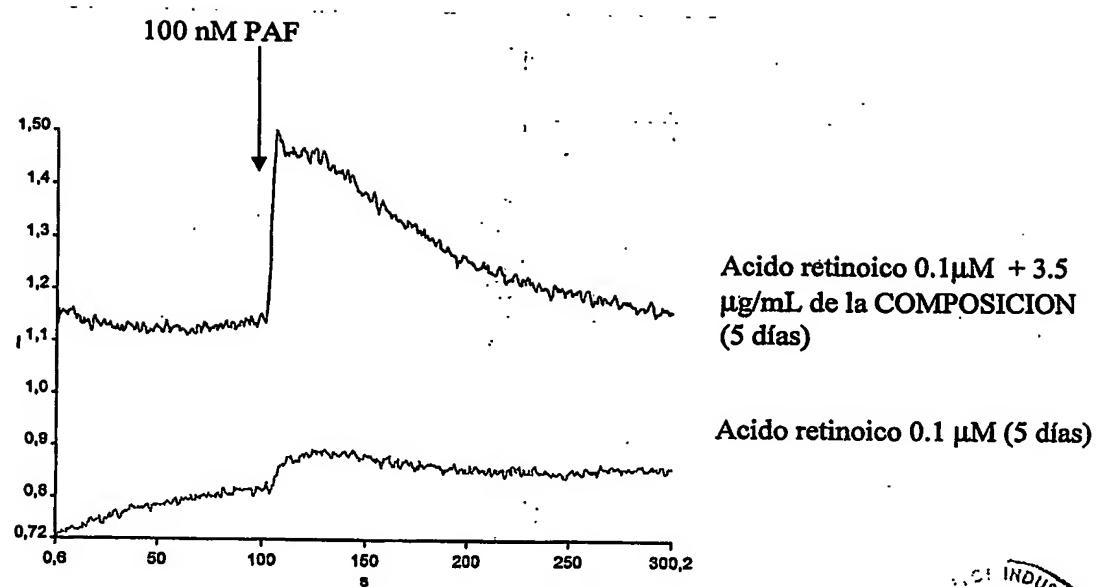
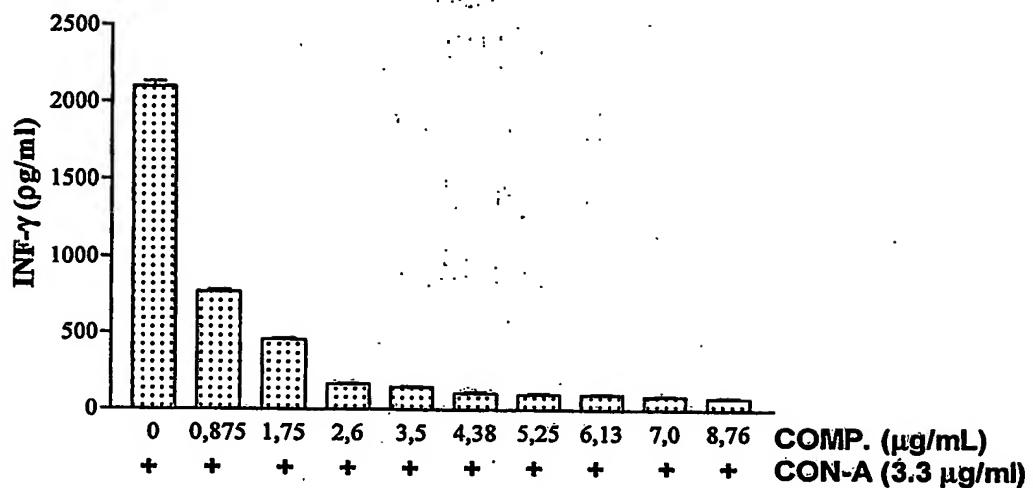


Figura 2

INF- γ (linfocitos T)



IL-2 (T-cells)

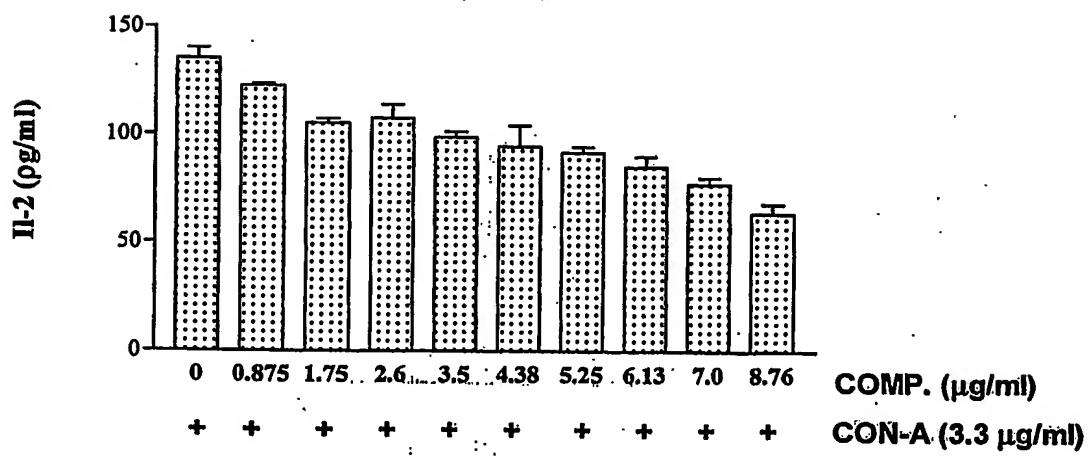


Figura 3

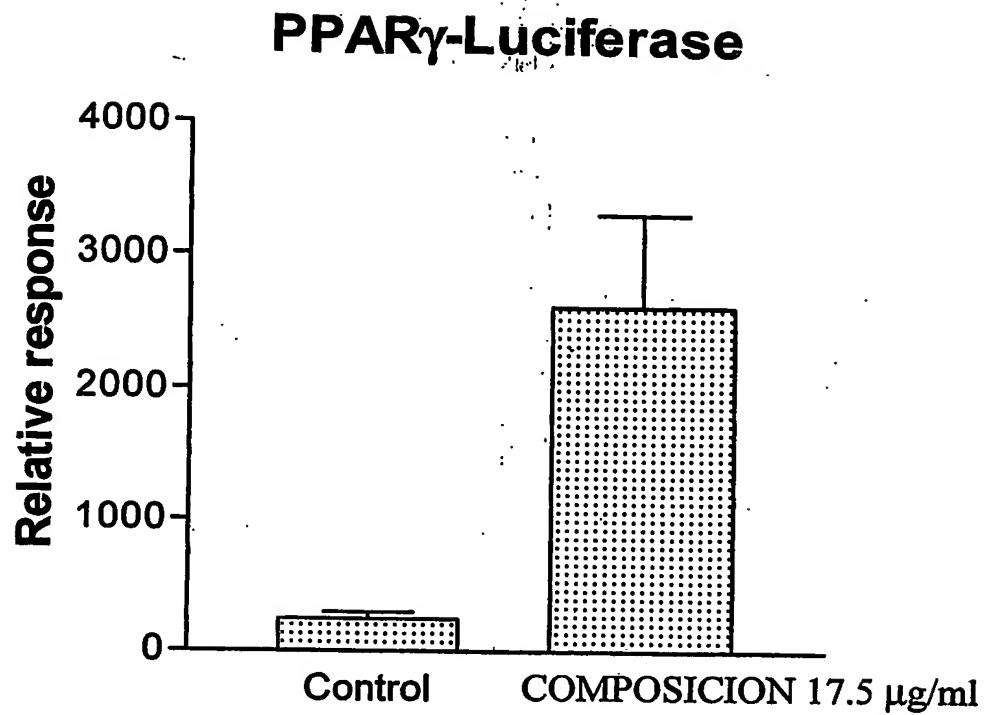


Figura 4

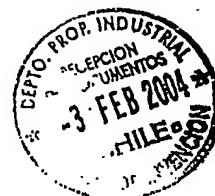
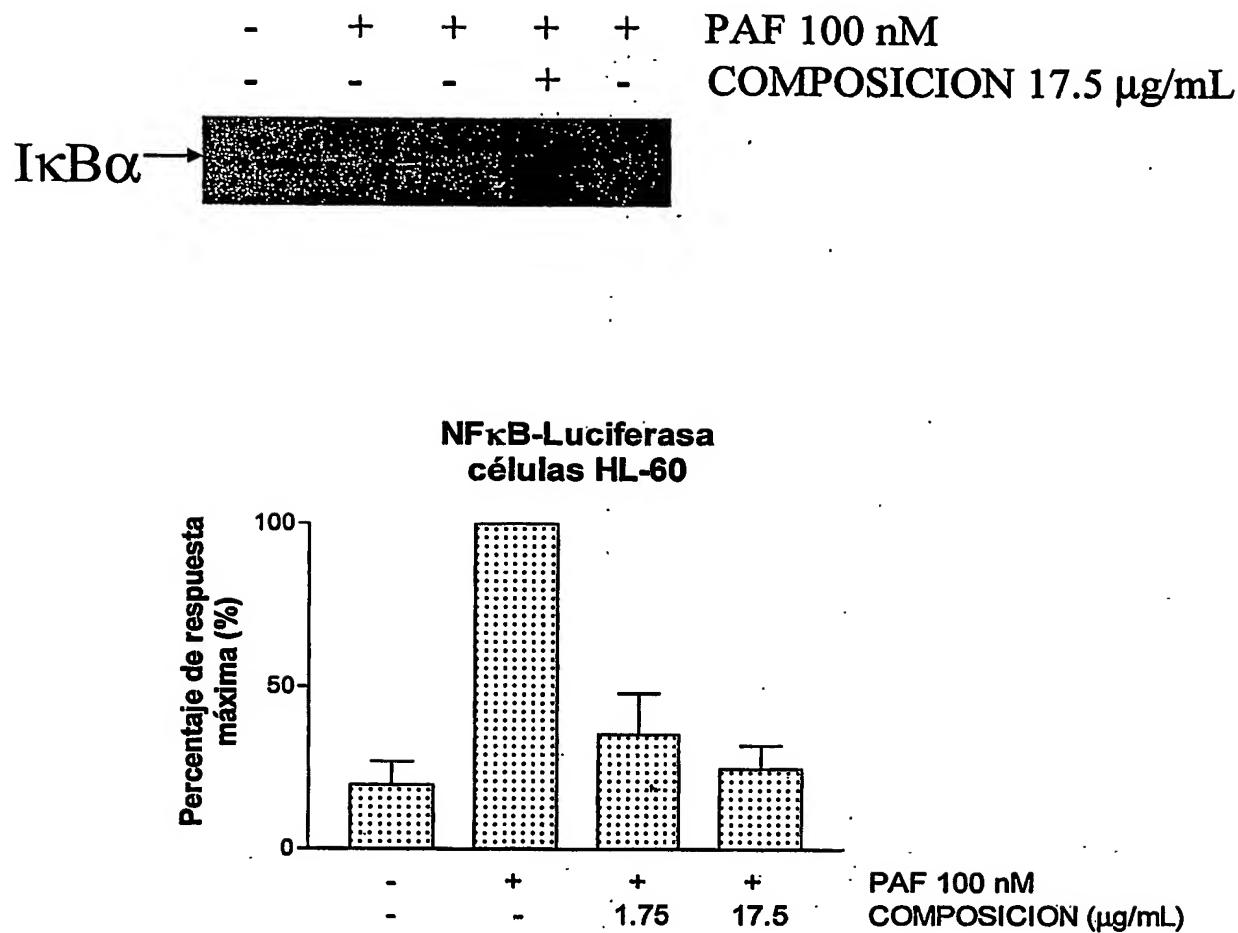


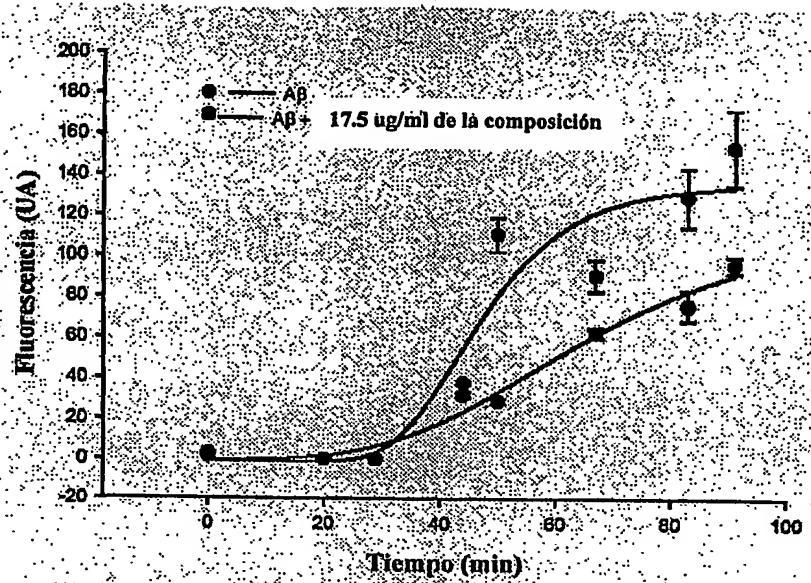
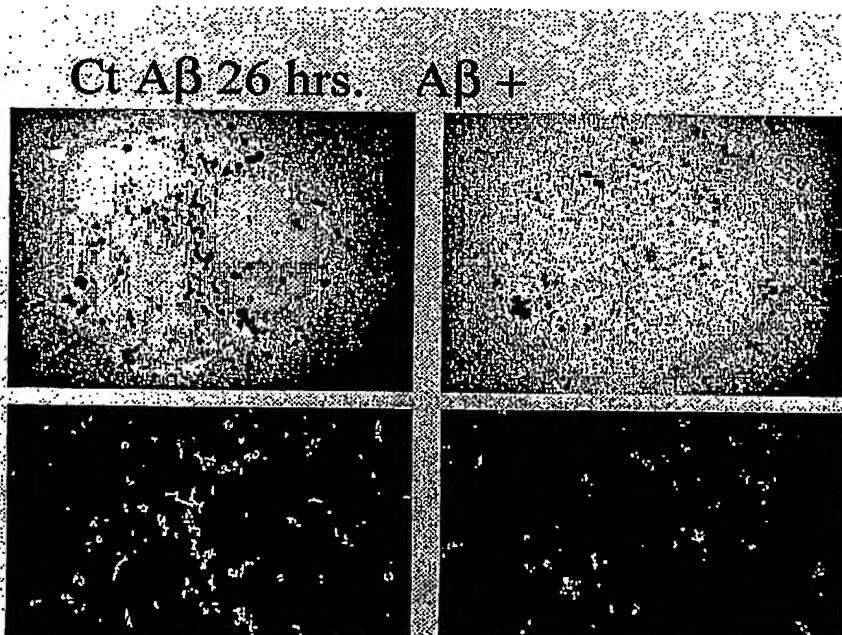
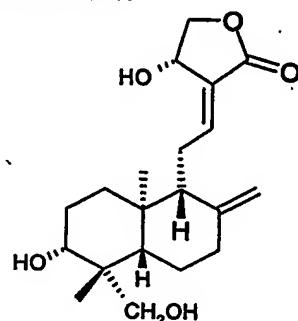
FIGURA 5**17.5 ug/ml de la composición****Figura 5**

FIGURA 6**Estructura química del andrografolido:**

- i. fórmula general: $C_{20}H_{30}O_5$
- ii. peso molecular : 350.46
- iii. nomenclatura molecular: 3-[2-[decahidro-6-hidroxi-5-(hidroximetil)-5,ha-dimetil-2-metilen-1-naftalenil]etilideno]dihidro-4-hidroxi-2(3h)-furanona.
- iv. estructura molecular:

**FIGURA 7****Estructura química del deoxiandrografolido:**

- i.) fórmula general: : $C_{20}H_{30}O_4$
- ii.) peso molecular: 336.46
- iii.) estructura molecular:

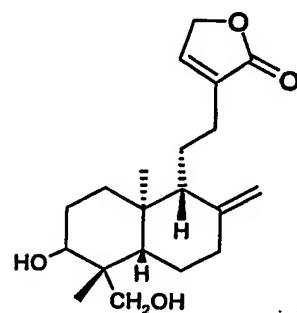
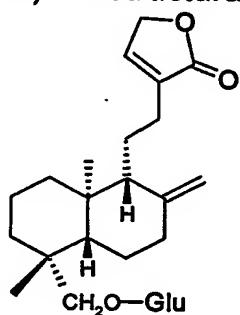


FIGURA 8**Estructura química del neoandrografolido:**

- i.) fórmula general: $C_{26}H_{41}O_8$
- ii.) peso molecular: 326.4
- iii.) estructura molecular:



DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG. 1 es un gráfico que muestra la movilización de Calcio inducida por PAF medida por la razón 340/380 nm utilizando células HL-60, marcadas con el indicador FURA2-AM. Las células fueron diferenciadas con ácido retinoico solo, o en presencia de la COMPOSICIÓN (3.5 µg/ml), como se describe en los ejemplos 1-2.

FIG. 2 es un gráfico de barras que muestra la actividad relativa de luciferasa de células HL-60 transfectadas con un vector que contiene el promotor de PPAR γ y el efecto de la COMPOSICIÓN.

FIG. 3 es un gráfico de barras que muestra la inhibición de la concentración de IL-2 y INF-gamma en células T activadas con concanavalina CONA por la COMPOSICIÓN.

FIG. 4 Muestra la inhibición de la degradación de I κ B α por la composición como a su vez un gráfico de barras que muestra el porcentaje de inhibición de la COMPOSICIÓN sobre la actividad relativa de luciferasa de células HL-60 transfectadas con un vector que contiene el promotor de NF κ B.

FIG. 5 es una microfotografía que muestra la inhibición de la formación de beta amiloide *in vitro* por la COMPOSICIÓN usando la tinción de tioflavina.

FIG. 6 Consiste en la descripción estructura química del Androgafolido.

FIG. 7 Consiste en la descripción estructura química del Dexoandrogafolido.

FIG. 8 Consiste en la descripción estructura química del NeoAndrogafolido.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.